

Effet des bactéries endoracinaires glaçogènes sur la résistance de la luzerne au gel

Serge Gagné

Département des sols, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation,
Université Laval, Québec (Québec), Canada G1K 7P4
Adresse actuelle: Centre de recherche Premier, Les tourbières Premier Ltée,
C.P. 2600, Rivière-du-Loup (Québec), Canada G5R 4C9

Claude Richard

Station de recherches, Agriculture Canada, 2560, boul. Hochelaga,
Sainte-Foy (Québec), Canada G1V 2J3. Contribution no 357

Hani Antoun

Département des sols, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation,
Université Laval, Québec (Québec), Canada G1K 7P4

(Reçu 1988-09-01; accepté 1989-01-08)

Parmi les bactéries isolées du xylème racinaire de la luzerne (*Medicago sativa*), nous avons observé que certaines sont glaçogènes. Les suspensions bactériennes que nous avons testées ont amorcé le gel de l'eau en surfusion à des températures voisines de -2°C . Ces bactéries ont été inoculées à la luzerne et les plantes furent ensuite soumises à un test de congélation. Selon les conditions expérimentales, les isolats testés ont provoqué un effet nuisible ou bénéfique sur la croissance des plantes avant même qu'elles soient soumises au test de congélation. Nous n'avons cependant pas observé d'effet statistiquement significatif de ces bactéries sur la tolérance de la luzerne au gel pouvant être attribuable à leur caractère glaçogène. Les isolats testés, qu'ils soient glaçogènes ou non, ont provoqué une augmentation de l'indice de brunissement des racines comparativement aux plantes non inoculées et les basses températures ont accru cet effet. Il est probable qu'avec le temps, ces bactéries contribuent à la détérioration des racines de la luzerne.

Gagné, S., C. Richard et H. Antoun. 1989. Effet des bactéries endoracinaires glaçogènes sur la résistance de la luzerne au gel. PHYTOPROTECTION 70: 63-73.

We found that some xylem-resident bacteria isolated from alfalfa (*Medicago sativa*) roots are ice nucleation active. The bacterial suspensions tested, initiated freezing of supercooled water at temperatures in the vicinity of -2°C . These bacteria were inoculated into alfalfa and the plants were then subjected to a freezing test. Depending on experimental conditions, the isolates produced deleterious or beneficial effects on plant growth even before they were subjected to the freezing test. We did not however observe any statistically significant effect on alfalfa frost tolerance attributable to the ice nucleation ability of the bacteria. The isolates, whether ice nucleation active or not, produced an increase in the discolouration of the root xylem compared with non-inoculated plants and low temperatures accentuated this effect. It is likely that, with time, these bacteria contribute to the deterioration of alfalfa roots.

Introduction

Certaines bactéries peuvent provoquer la cessation de surfusion de l'eau et la formation de cristaux de glace à des températures voisines de -1°C (Maki *et al.* 1974; Vali *et al.* 1976). Mis à part la glace elle-même, les bactéries constituent les agents nucléateurs les plus efficaces qu'on connaisse dans la nature. Jusqu'à maintenant, le pouvoir glaçogène n'a été observé que chez un nombre restreint d'espèces bactériennes: le

Pseudomonas syringae van Hall (Arny *et al.* 1976; Maki *et al.* 1974), le *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson (Paulin et Luisetti 1978; Young 1987), le *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula (Maki et Willoughby 1978), l'*Erwinia herbicola* (Löhnis) Dye (Lindow *et al.* 1978a) et le *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* (Jones *et al.*) Dye (Azad et Schaad 1988; Kim *et al.* 1987).

L'intérêt déployé pour les bactéries glaçogènes depuis quelques années vient principalement de l'influence qu'elles semblent avoir sur les dégâts causés par le gel chez

les plantes qui ne s'endurcissent pas au froid. Ainsi, plusieurs chercheurs ont démontré que la présence des bactéries glaçogènes diminuait la tolérance de certaines plantes au gel parce que ces bactéries provoquent la cessation de la surfusion à des températures où ces plantes peuvent normalement éviter le gel (Anderson *et al.* 1982, 1984; Arny *et al.* 1976; Ashworth *et al.* 1985b; Azad et Schaad 1988; Gusta et O'Connor 1987; Kim *et al.* 1987; Lindow 1983; Lindow *et al.* 1978a, 1982a, 1982b; Wallin *et al.* 1979; Yelenosky 1983).

Chez les plantes qui s'endurcissent au froid, le rôle des bactéries glaçogènes n'a pas été étudié. Ces plantes diffèrent des plantes sensibles au gel dans leur capacité à tolérer la formation de glace dans leurs tissus. Chez ces espèces, la glace se forme en premier lieu dans les espaces intercellulaires. La membrane plasmique et la paroi cellulaire empêchent la croissance du cristal de glace dans le protoplasme. Cependant, si le gel est trop rapide, il y a formation de glace intracellulaire, ce qui brise les structures cytoplasmiques et cause la mort des cellules. C'est ce qui se produit lorsque l'eau en surfusion gèle soudainement (Siminovitch 1981). Lindow (1982) a émis l'hypothèse que la présence d'agents nucléateurs exogènes tels les bactéries glaçogènes pourrait être bénéfique pour les plantes tolérant le gel en permettant la formation de glace de façon lente et non dommageable à des températures proches de 0°C.

Nous avons observé que certaines bactéries endoracinaires de la luzerne (*Medicago sativa* L.) montraient une activité glaçogène *in vitro* (Richard *et al.* 1987). Quoique Gaudet *et al.* (1980) aient mentionné que certains isolats de *Pseudomonas syringae* provenant de racines de sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) semblaient glaçogènes, aucune étude n'a jamais été rapportée, à notre connaissance, sur l'effet des bactéries glaçogènes dans les racines des plantes. Dans ce travail, nous avons déterminé la fréquence de nucléation de deux isolats glaçogènes provenant de racines de luzerne et étudié leur effet sur la survie, le rendement et l'état sanitaire des racines en soumettant les plantes à des basses températures. Nous avons aussi vérifié si les bactéries glaçogènes

affectaient la surfusion de l'eau dans les racines.

Matériel et méthodes

Mesure de l'activité glaçogène des suspensions bactériennes. L'activité glaçogène de deux pseudomonades (LPS-2-3 et LPS-6-4) provenant du xylème racinaire de la luzerne (Richard *et al.* 1987) a été mesurée par la méthode de Vali (1971) adaptée par Lindow *et al.* (1982a). Les bactéries furent cultivées pendant 48 h sur milieu NAG (Nutrient agar, Difco + 2,5% de glycérine) à 18°C. Nous avons ensuite recueilli les cellules dans du tampon phosphate stérile (0,01 M à pH 7,0 préparé avec de l'eau bidistillée) et préparé une série de 10 dilutions décimales. La concentration des bactéries a été déterminée en étalant sur milieu NAG des volumes de 0,01 mL des dilutions appropriées. Pour chaque dilution, nous avons déposé 30 gouttelettes de 0,01 mL dans un couvercle de boîte de Petri que nous avons recouvert d'un autre couvercle en verre.

Nous avons placé le tout sur une plaque réfrigérante (Thermoelectric cold plate, model TCP-2, Thermoelectrics Unlimited Inc., Wilmington, DE) et abaissé graduellement la température à raison d'environ 0,3°C/min. La température de la surface de la boîte de Petri était mesurée avec un thermocouple de type K (chromel-alumel). Nous avons ainsi noté la température de gel et le nombre de gouttelettes gelées au fur et à mesure que la température diminuait. Le nombre cumulé de nucléateurs par unité de volume de la suspension testée qui sont actifs à partir d'une température donnée $N(T)$ a été calculé par l'équation de Vali (1971):

$$N(T) = -\ln(f) V^{-1}$$

où f est la fraction des gouttelettes non gelées à la température T et V est le volume de chaque gouttelette. Comme le nucléateur le plus actif (c.-à-d. celui qui déclenche le gel à la plus haute température) va déterminer la température de gel de la gouttelette, on détecte ainsi seulement les nucléateurs les plus actifs dans chaque gouttelette. Afin d'obtenir le spectre d'activité complet des

nucléateurs, on utilise une série de dilutions qui permettent de détecter les nucléateurs moins actifs (actifs à des températures plus basses) mais plus nombreux. Les nombres de nucléateurs calculés pour chaque dilution sont normalisés par rapport à la concentration de la suspension originale. La fréquence de nucléation est la proportion de cellules actives à une température donnée et elle est déterminée en divisant le nombre de nucléateurs/mL par la concentration bactérienne (cellules/mL).

Tests de congélation. Expérience A. Des graines de luzerne cv. Saranac ont été désinfectées en surface (alcool éthylique à 95 %, 2 min; hypochlorite de sodium à 6 %, 10 min; cinq rinçages avec de l'eau distillée stérile) puis semées en caissettes dans un mélange stérile de terreau et de vermiculite (5:1 en volume). Après 1 semaine de croissance, nous avons arrosé les plantules uniformément d'une suspension de la souche BALSAC du *Rhizobium meliloti* Dangeard de façon à assurer une bonne nodulation. Cinq semaines après le semis, nous avons déterré les plantes et coupé le feuillage et les racines à environ 3 cm du collet. Les plantes furent ensuite inoculées en les trempant durant 30 min dans une suspension bactérienne contenant 10^8 cellules par mL. L'inoculum a été préparé à partir de cultures bactériennes sur milieu NAG (âgées de 6 jours et incubées à 18°C) dont nous avons recueilli et mis en suspension les cellules dans du tampon phosphate 0,01 M stérile à pH 7,0. Nous avons utilisé l'isolat glaçogène LPS-2-3 et l'isolat non glaçogène 488, tous deux provenant du xylème de racines de luzerne et identifiés comme étant vraisemblablement des *P. syringae*.

Après l'inoculation, les plantes furent repotées dans des pots de 10 cm de diamètre à raison de cinq plantes par pot dans du mélange commercial Redi-Earth (F. Hyde & Co. Ltd., Montréal). Nous avons de plus ajouté 40 mL d'inoculum à chaque pot. Les plantes témoins n'ont reçu que du tampon phosphate sans bactérie. Nous avons par la suite laissé croître les plantes pendant 6 semaines en chambre de croissance (photopériode de 16 h à $350 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, température de 22-24°C le jour et 15-18°C la

nuite) avant de procéder à leur durcissement au froid pendant 3 semaines à 1°C avec une photopériode de 8 h et une intensité lumineuse de $125 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$. Les plantes furent ensuite coupées et soumises à un test de congélation tel que décrit par Richard *et al.* (1982). Ce traitement consiste à placer les plantes dans un congélateur programmé dont la température est abaissée de 2°C sur une période de 1 h et maintenue ensuite pendant 2 h avant d'amorcer une autre descente de 2°C. On procède ainsi de -2°C jusqu'à -18°C et après chaque abaissement de 2°C suivi d'une pause de 2 h, les pots préassignés sont enlevés du congélateur et placés à 1°C pendant 24 h et ensuite pendant 3 semaines dans les conditions de croissance initiales. Des pots témoins sont gardés à 1°C au cours du test de congélation.

Afin d'avoir une idée du taux de colonisation des tissus par les bactéries, nous avons prélevé les racines de deux plantes de chaque traitement juste avant d'effectuer le test de congélation et déterminé le nombre total de bactéries ainsi que le nombre de bactéries glaçogènes dans le xylème de chaque racine selon la méthode décrite par Richard *et al.* (1987). Les plantes utilisées provenaient de pots supplémentaires prévus à cet effet.

Après la repousse, nous avons déterminé les pourcentages de survie de même que l'indice de brunissement des racines selon l'échelle Horsfall-Barratt (Horsfall et Cowling 1978). Nous avons également noté les rendements avant le test de congélation et à la fin de l'expérience. Le dispositif expérimental comprenait 10 répétitions pour chaque température et pour chaque traitement bactérien (300 pots au total) et les pots étaient disposés complètement au hasard. Les analyses de variances ont été effectuées sur les valeurs pondérées selon l'inverse d'un estimé de la variance (Scheffé 1959). Cette analyse pondérée est recommandée lorsque la variance est inégale; elle accorde moins de poids aux valeurs dont la variance est grande, et plus à celles dont la variance est plus faible. Les traitements ont été comparés par la méthode des contrastes. Dans le cas des pourcentages de survie, nous avons effectué les analyses selon la méthode des probits de Finney (1971).

Expérience B. Nous avons préparé des suspensions bactériennes (10^{10} cellules par mL de tampon phosphate) des isolats glaçogènes LPS-2-3 et LPS-6-4 et de l'isolat non glaçogène 488. Des graines de luzerne (cv. Saranac) germées furent trempées dans l'inoculum pendant au moins 1 h avant d'être semées (quatre par pot) dans des godets en mousse de tourbe placés dans des pots de 6 cm. Le substrat utilisé fut un mélange à rempotage commercial (Pro-Mix BX, Les Tourbières Premier Ltée, Rivière-du-Loup, Québec) et du terreau (3:1 en volume) stérilisés. Deux semaines après le semis, nous avons inoculé les plantules avec une suspension de la souche BALSAC du *R. meliloti*. À 5 semaines, les plantes furent dépotées et la motte fut coupée transversalement à 3 cm du collet des plantes de façon à infliger des blessures aux racines qui soient uniformes d'un pot à l'autre. La base de la partie supérieure de la motte fut trempée pendant 15 s dans une suspension bactérienne contenant 10^9 cellules par mL de tampon phosphate, puis replacée dans le pot original. Les plantes témoins furent traitées de la même façon avec du tampon phosphate sans bactérie. L'utilisation de godets en mousse de tourbe permet de dépoter facilement les plantes et de couper la motte sans qu'elle se brise. Nous avons ensuite coupé le feuillage et inoculé les chaumes à l'aide d'un écouvillon imbibé de suspension bactérienne, et nous avons recouvert chaque pot d'un sac de plastique transparent pendant 4 jours. Après 4 semaines de repousse, les plantes furent endurcies au froid et soumises à un test de congélation tel que décrit précédemment. Une période de repousse de 4 semaines au lieu de 6 nous est apparue suffisante pour que les plantes puissent ensuite être endurcies adéquatement, ce qui permet, de ce fait, de raccourcir la durée de l'expérience. Le dispositif expérimental et les paramètres étudiés sont également demeurés les mêmes que pour l'expérience A.

Effet des bactéries glaçogènes sur la surfusion de l'eau dans les racines. Les plantes ont été cultivées, inoculées et endurcies au froid tel que décrit précédemment (tests de congélation, expérience B). Après l'endurcissement, nous avons effectué un test de nucléation en éprouvettes (Hirano et Uppér 1986; Hirano *et al.* 1985).

À cet effet, nous avons déterré et lavé les racines, puis nous avons prélevé sur chaque plante un segment de racine d'environ 0,2 g juste en-dessous du collet. Les segments furent trempés quelques secondes dans de l'alcool éthylique à 95 %, flambés, coupés longitudinalement en deux sections et immergés dans des éprouvettes contenant 2 mL d'eau bidistillée. Nous avons préalablement vérifié que les éprouvettes étaient exemptes de nucléateurs actifs à -10°C . Nous avons placé les éprouvettes dans un bain réfrigérant Lauda (Model RCS-6, Brinkmann Instrument Co., Rexdale, Ontario) à $-2,0^{\circ}\text{C}$ pendant 30 min, puis nous avons abaissé graduellement la température (environ $0,04^{\circ}\text{C}/\text{min}$) jusqu'à ce que tous les tubes soient gelés. Lorsqu'un nucléateur est actif à la température atteinte, il y a formation d'un cristal de glace qui déclenche le gel de tout le contenu de l'éprouvette. Nous avons donc noté au fur et à mesure la température de gel de chaque tube indiquant la présence dans le segment de racine de nucléateurs actifs à cette température. Nous avons ainsi testé 20 racines de chaque traitement (18 dans le cas des témoins).

Résultats

Activité glaçogène des bactéries. Nous avons quantifié l'activité glaçogène in vitro des isolats LPS-2-3 et LPS-6-4 provenant de racines de luzerne. Dans le cas de l'isolat LPS-6-4, le seuil de température maximale auquel nous avons détecté une activité glaçogène s'est situé entre -2° et -3°C (fig. 1A). Seulement une très faible proportion des cellules (une cellule sur 10^8 à 10^{10}) a exprimé une activité glaçogène à ces températures. À -5°C , nous avons observé qu'une cellule sur environ 10^7 était active comme nucléateur. L'activité glaçogène semble augmenter de façon plus marquée avec la diminution de la température entre -2° et -4°C et entre -6° et -9°C .

Les suspensions de l'isolat LPS-2-3 ont montré une plus forte activité glaçogène que l'isolat LPS-6-4 (fig. 1B). Nous avons observé la présence de nucléateurs actifs à partir de -1° à -2°C . À ces températures, la fréquence de nucléation pour la bactérie LPS-2-3 a été d'environ 10^{-4} à 10^{-7} . L'activité glaçogène a augmenté rapidement

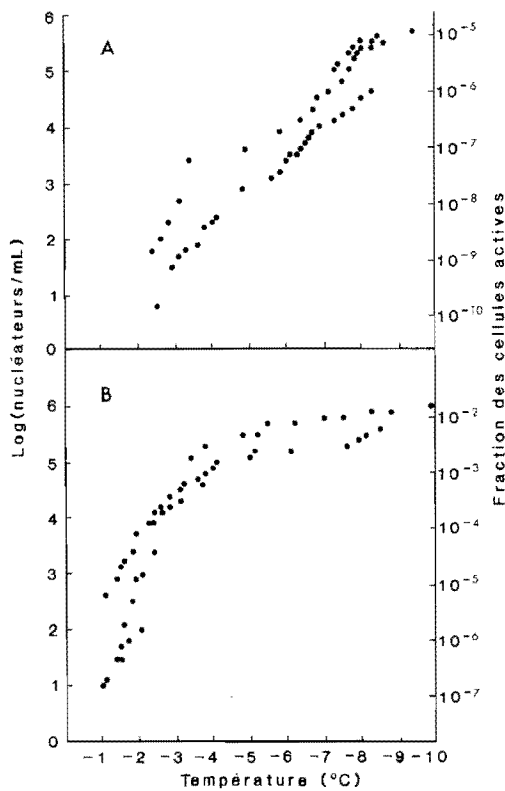


Figure 1. Concentration cumulative de nucléateurs et fraction des cellules actives en fonction de la température pour les bactéries (A) LPS-6-4 et (B) LPS-2-3. Les suspensions bactériennes originales contenaient respectivement 4×10^{10} et 6×10^7 cellules/mL.

avec la baisse de la température jusqu'à environ -5°C pour ensuite se stabiliser à une cellule active sur 10^2 à 10^3 .

Des gouttelettes de tampon phosphate ou de suspension de l'isolat 488 non glaçogène

testées selon les mêmes conditions ont gelé entre -10° et -22°C .

Effet des bactéries glaçogènes sur les plantes de luzerne soumises à un test de congélation. Lors de la première expérience, la présence des bactéries a considérablement affecté la croissance des plantes avant même qu'elles soient soumises au test de congélation (tableau 1). Cependant, l'effet de l'isolat glaçogène (*P. syringae* LPS-2-3) sur le rendement moyen n'était pas statistiquement différent ($P > 0,05$) de l'isolat non glaçogène (*P. syringae* 488). Nous avons dénombré les bactéries des racines avant d'effectuer le test de congélation. Les nombres totaux observés chez les plantes témoins, chez celles inoculées avec l'isolat 488 et celles avec l'isolat LPS-2-3 ont été respectivement de $1,3 \times 10^6$, $7,2 \times 10^5$ et $3,0 \times 10^6$ UFC (unités formant une colonie)/g de xylème frais. Alors qu'aucune bactérie glaçogène n'a été détectée dans le cas des deux premiers traitements, 73 % des bactéries ($2,2 \times 10^6$ UFC/g de xylème frais) étaient glaçogènes chez les racines provenant de plantes inoculées avec l'isolat LPS-2-3. Suite au test de congélation, la bactérie LPS-2-3 a causé une diminution de la résistance des plantes au gel (TL_{50}) de $1,5^{\circ}\text{C}$ par rapport au témoin non inoculé et de $0,8^{\circ}\text{C}$ comparativement à l'isolat non glaçogène 488 (tableau 1).

Les courbes estimées de la survie en fonction de la température (fig. 2) montrent qu'à partir de -4°C , les plantes inoculées avec la bactérie glaçogène ont moins bien survécu au test de congélation que les témoins alors que dans le cas de l'isolat non glaçogène, la courbe ne diverge du témoin qu'à

Tableau 1. Effet des bactéries sur les rendements et sur la résistance de la luzerne au gel

Bactérie	Expérience A		Expérience B	
	Rendement avant congélation (g mat. sèche/pot)	TL_{50} § ($^{\circ}\text{C}$)	Rendement avant congélation (g mat. sèche/pot)	TL_{50} ($^{\circ}\text{C}$)
LPS-6-4 (glaçogène)	—	—	0,96 a†	$-9,5 \pm 0,2$
LPS-2-3 (glaçogène)	0,77 b†	$-7,6 \pm 0,5$	1,01 a	$-9,7 \pm 0,7$
488 (non-glaçogène)	0,85 b	$-8,4 \pm 0,2$	1,02 a	$-10,2 \pm 0,4$
Témoin	2,23 a	$-9,1 \pm 0,6$	0,89 b	$-10,2 \pm 0,6$

§ Température létale pour 50 % de la population \pm écart type.

† Dans une même colonne, les moyennes qui ne sont pas suivies de la même lettre sont significativement différentes selon le test de Duncan ($P = 0,05$).

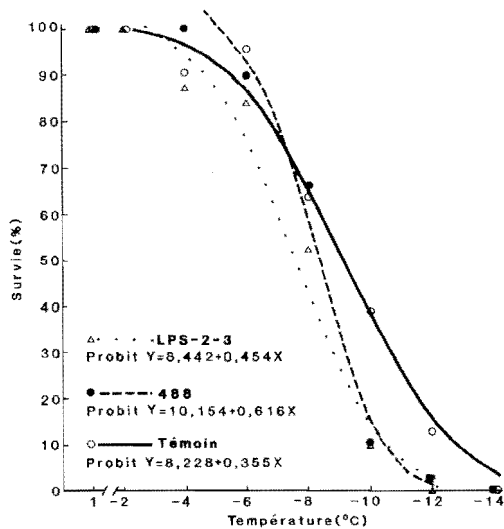


Figure 2. Effet des basses températures sur la survie des plantes de luzerne inoculées avec une bactérie glaçogène (LPS-2-3) ou non glaçogène (488) comparativement aux plantes non inoculées (témoins). Expérience A.

partir d'environ -8°C . Cependant, l'analyse statistique a révélé que l'interaction traitement \times température n'était pas significative ($P > 0,05$) (les pentes des droites ne sont pas différentes) et que dans l'ensemble, les différences entre les traitements ne sont pas statistiquement significatives ($P > 0,05$).

Le rendement des plantes après le test de congélation fournit une meilleure appréciation de l'effet des basses températures que le pourcentage de survie car en dépit d'une certaine relation entre ces deux facteurs, les plantes peuvent survivre à des températures critiques alors que leur repousse à ces températures peut être négligeable. L'effet de la température sur le rendement pour chacun des traitements est indiqué à la figure 3. À toutes les températures entre -2° et -10°C , les rendements furent inférieurs chez les plantes inoculées avec l'une ou l'autre des deux bactéries comparativement aux plantes témoins ($P < 0,0001$). La différence entre les deux traitements bactériens n'est toutefois pas significative ($P = 0,2179$). L'expérience ne permet pas de dissocier un effet quelconque sur les rendements qui pourrait être attribuable au caractère glaçogène de l'isolat LPS-2-3. La

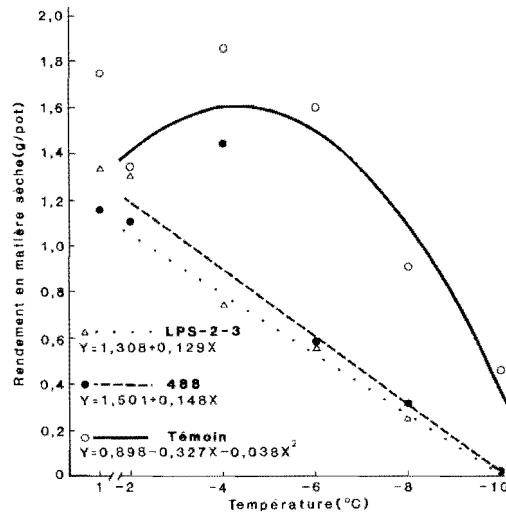


Figure 3. Effet des basses températures sur les rendements de la luzerne inoculée avec un isolat glaçogène (LPS-2-3) ou un isolat non glaçogène (488) comparativement aux plantes non inoculées (témoins). Expérience A.

baisse de rendement observée par rapport au témoin semble plutôt associée au pouvoir pathogène des bactéries dans les conditions expérimentales présentes.

L'indice de brunissement des racines a été significativement plus élevé chez les plantes inoculées que chez les plantes témoins ($P < 0,001$) mais la différence entre l'effet des deux bactéries n'est pas significative ($P = 0,2819$) (fig. 4). L'indice moyen très élevé à -10°C chez les plantes inoculées avec l'isolat 488 est probablement dû au fait que les racines examinées étaient très affectées par le gel.

Dans la seconde expérience, nous avons testé l'isolat glaçogène LPS-6-4 en plus des deux bactéries de l'expérience A. Aucun effet pathologique n'a été observé chez les plantes avant qu'elles soient soumises au test de congélation, ce qui est sans doute attribuable au fait que le traitement infligé aux plantes lors de l'inoculation a été moins sévère que dans l'expérience précédente. Nous avons même observé des rendements moyens significativement plus élevés ($P \leq 0,05$) avant congélation chez les plantes inoculées que chez les témoins sans bactérie (tableau 1).

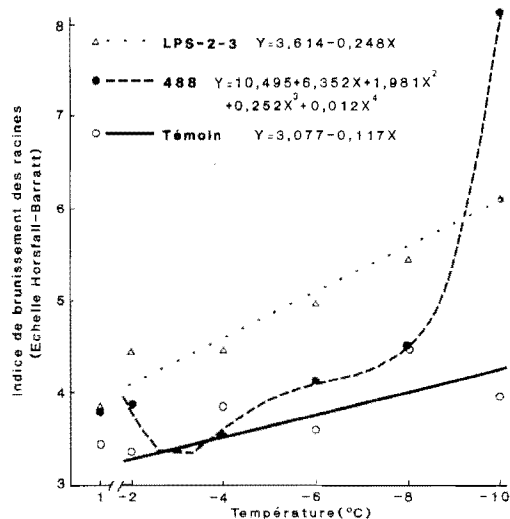


Figure 4. Effet des basses températures sur l'indice de brunissement des racines de plantes de luzerne inoculées avec une bactérie glaço-gène (LPS-2-3) ou non glaço-gène (488) comparativement aux plantes non inoculées (témoins). Expérience A.

La résistance des plantes au gel (TL_{50}) n'a pas été affectée substantiellement par les traitements bactériens lors de l'expérience B (tableau 1). Aux températures inférieures à -7°C , on observe toutefois une légère diminution du taux de survie par rapport au témoin chez les plantes inoculées avec les isolats glaço-gènes (fig. 5). La courbe estimée pour l'isolat 488 est identique à celle du traitement témoin. L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative entre les traitements ($P > 0,05$) et l'effet de la température sur le pourcentage de survie est le même pour tous les traitements ($P > 0,05$).

L'effet des basses températures sur le rendement a produit des courbes identiques ($P = 0,8506$) pour les plantes inoculées avec l'une ou l'autre des deux bactéries glaço-gènes (fig. 6). À mesure que la température descend en-dessous de -6°C , on note que la baisse de rendement est significativement plus importante ($P = 0,0068$) chez les plantes inoculées avec les isolats LPS-2-3 ou LPS-6-4 comparativement au témoin et à l'isolat non glaço-gène. L'inoculation de la bactérie 488 a également diminué les rendements par rapport au témoin ($P = 0,0505$)

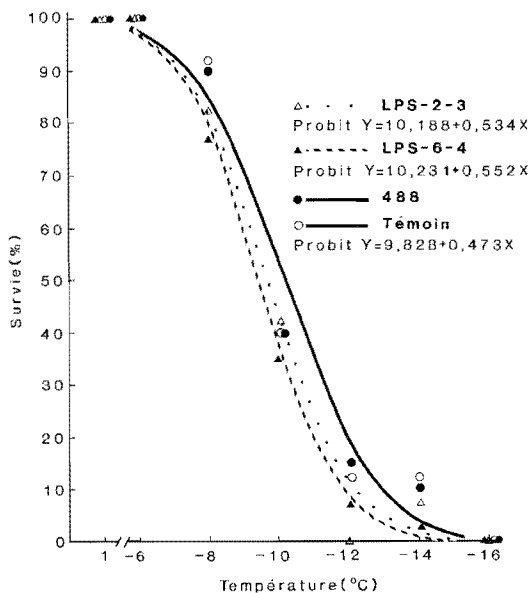


Figure 5. Effet des basses températures sur la survie des plantes de luzerne inoculées avec les bactéries glaço-gènes LPS-2-3 ou LPS-6-4 ou avec la bactérie non glaço-gène 488 comparativement aux plantes témoins non inoculées. Expérience B.

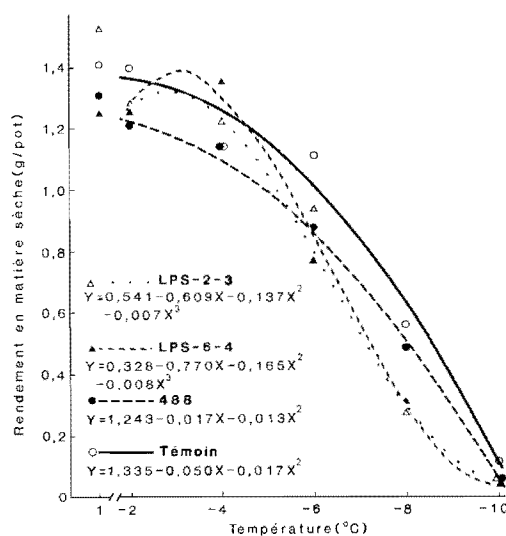


Figure 6. Effet des basses températures sur les rendements de la luzerne inoculée avec les bactéries glaço-gènes LPS-2-3 ou LPS-6-4 ou la bactérie non glaço-gène 488 comparativement aux plantes témoins non inoculées. Expérience B.

après que les plantes eurent subi l'effet des basses températures.

En général, le brunissement des vaisseaux racinaires a été plus élevé chez les plantes inoculées que chez les plantes témoins (fig. 7) et la diminution des températures a provoqué une augmentation des zones nécrosées selon une tendance quadratique ($P < 0,0001$). L'interaction traitement \times température n'est cependant pas significative ($P = 0,3001$), ce qui indique que les courbes sont statistiquement parallèles. L'isolat LPS-2-3 a provoqué un brunissement plus prononcé que l'isolat LPS-6-4 avec une probabilité atteignant presque le seuil de signification ($P = 0,0525$). L'isolat 488 a aussi augmenté le brunissement racinaire de façon significative ($P = 0,0041$) par rapport au témoin non inoculé.

Effet des bactéries sur la surfusion de l'eau dans les racines. La majorité des segments de racines ont gelé entre -5° et -6°C (fig. 8). Les proportions des racines ayant gelé à des températures supérieures ou égales à -5°C furent de 40 et 45 % chez les plantes inoculées avec les bactéries glaço-

gène LPS-6-4 et LPS-2-3 respectivement. Par contre, cette proportion a été de seulement 5 % chez les plantes témoins ou inoculées avec l'isolat 488 non glaço-gène. On note également que dans 10 % des racines inoculées avec l'isolat LPS-6-4, la température de surfusion de l'eau n'a pas dépassé -3°C .

Discussion

Les résultats démontrant l'activité glaço-gène des suspensions de l'isolat LPS-2-3 sont comparables à ceux obtenus par Lindow *et al.* (1978b) pour le *P. syringae*. La forme générale du spectre d'activité obtenu en fonction de la température est typique des isolats de cette espèce (Lindow *et al.* 1982a). Dans le cas de l'isolat LPS-6-4, la fréquence de nucléation a été beaucoup moins élevée et le spectre d'activité obtenu s'apparente plutôt à ceux déterminés pour des isolats d'*E. herbicola* (Lindow *et al.* 1978b; Phelps *et al.* 1986) ou de *X. campestris* pv. *translucens* (Kim *et al.* 1987).

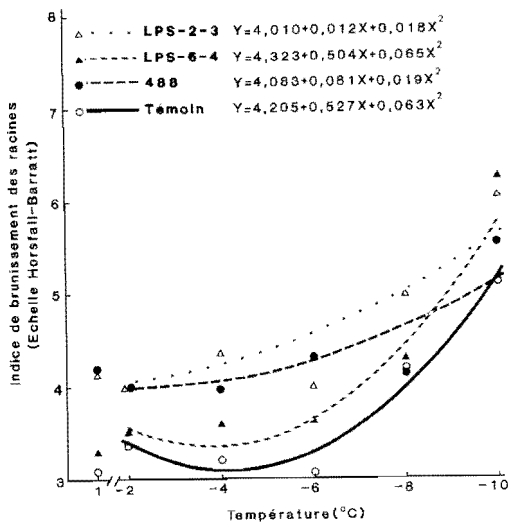


Figure 7. Effet des basses températures sur l'indice de brunissement des racines de plantes de luzerne inoculées avec les bactéries glaço-gènes LPS-2-3 ou LPS-6-4 ou avec la bactérie non glaço-gène 488 comparativement aux plantes témoins non inoculées. Expérience B.

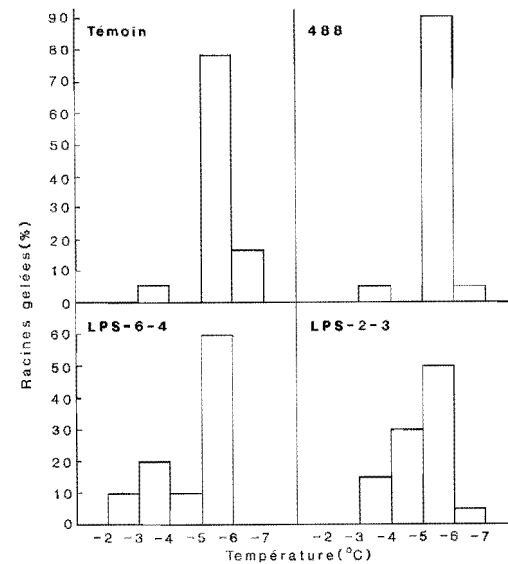


Figure 8. Pourcentages de racines gelées par intervalle de 1°C déterminés par un test de nucléation en tubes adapté de Hirano et Upper (1986). Le test est effectué à partir de segments de racines prélevés de plantes de luzerne non inoculées (témoin) ou inoculées avec les bactéries glaço-gènes LPS-2-3 ou LPS-6-4 ou avec la bactérie non glaço-gène 488.

Les expériences de congélation avec des plantes inoculées avec des bactéries glaço-gènes ou non glaço-gènes ou bien non inoculées ont donné des résultats variables quant à l'effet des basses températures sur les divers paramètres étudiés. Dans la première expérience, les bactéries ont provoqué des diminutions de rendement de plus de 60 % avant même que les plantes ne soient soumises au gel. On pouvait donc s'attendre à ce que les plantes s'endurcissent moins bien et soient moins tolérantes aux basses températures que les plantes témoins car en général, les facteurs qui restreignent le développement des plantes (insectes, maladies, nématodes, troubles physiologiques) réduisent aussi l'activité photosynthétique, l'accumulation des réserves et la tolérance au gel (Paquin 1985). Cette baisse prévue de la résistance au gel a eu des répercussions substantielles sur les rendements de la luzerne après le test de congélation, mais le taux de survie a été peu affecté si l'on en juge par une diminution de la température létale (TL₅₀) de seulement 1,5°C chez les plantes inoculées avec l'isolat glaço-gène LPS-2-3. Cette diminution est toutefois comparable à celle provoquée par le *Fusarium acuminatum* Ellis et Everh. dans une expérience semblable visant à évaluer l'effet du pourridié fusarien sur la résistance de la luzerne au gel (Richard *et al.* 1982). Quoique les valeurs estimées par l'analyse de régression des pourcentages de survie et des rendements en fonction de la température soient légèrement plus basses dans le cas de l'isolat glaço-gène LPS-2-3 que l'isolat non glaço-gène 488, les différences ne sont pas assez évidentes dans cette expérience pour dissocier un effet quelconque qui serait dû au pouvoir glaço-gène des bactéries plutôt qu'à leur effet pathologique.

Dans la seconde expérience, les bactéries n'ont pas eu d'effet nuisible sur les plantes d'après la mesure des rendements effectuée avant le test de congélation et nous avons même observé des rendements supérieurs aux témoins chez les plantes inoculées avec l'une ou l'autre des bactéries testées. Cet effet inconstant des bactéries qui, d'une expérience à l'autre, a varié de pathologique à bénéfique pourrait être attribuable à l'utilisation de méthodes d'inoculation différentes. Divers facteurs environnementaux

peuvent aussi influencer grandement l'effet des rhizobactéries sur les plantes (Suslow 1982).

Les résultats obtenus suite au test de congélation de l'expérience B montrent certaines indications à l'effet que le caractère glaço-gène des bactéries pourrait contribuer à accentuer l'effet dommageable des basses températures sur la luzerne. Ainsi, les courbes estimées pour les pourcentages de survie en fonction de la température sont légèrement plus basses (bien que non statistiquement différentes) dans le cas des plantes traitées avec les isolats glaço-gènes comparativement aux plantes non inoculées ou inoculées avec l'isolat non glaço-gène. Nous avons également observé un effet sur les rendements à partir de -6°C dû aux bactéries glaço-gènes. D'autre part, selon cette expérience, il ne semble pas y avoir de relation apparente entre l'effet des bactéries sur la survie ou le rendement et leur effet sur l'indice de brunissement des racines. Par exemple, l'isolat LPS-6-4 est celui qui a le plus diminué la survie alors qu'il a le moins affecté l'indice de brunissement. De plus, avant de procéder au test de congélation, l'état sanitaire des plantes était apparemment identique pour les trois traitements bactériens, ce qui porte à croire que les légères différences observées dans le taux de survie et les rendements après le gel pourraient être dues au caractère glaço-gène des isolats LPS-6-4 et LPS-2-3.

Le test de nucléation en éprouvettes effectué à partir de segments de racines a montré que les bactéries pouvaient affecter la température de surfusion des racines. Une proportion élevée des parties de racines n'ont pas été affectées par les bactéries probablement parce qu'elles n'ont pas colonisé la racine en nombre suffisant de sorte que la probabilité qu'une cellule soit active comme nucléateur est alors infime. Nous avons d'ailleurs observé précédemment (Gagné *et al.* 1987) que le nombre de bactéries isolées des racines de luzerne après inoculation selon différentes méthodes était très variable d'une plante à l'autre. Si on se base sur les fréquences de nucléation observées *in vitro* pour les isolats LPS-2-3 et LPS-6-4, les nombres de cellules nécessaires pour déclencher la cristallisation à des tempéra-

res supérieures à -5°C sont respectivement de 10^2 à 10^3 et 10^6 à 10^7 . Anderson *et al.* (1987) ont rapporté que l'activité glaçogène des bactéries sur les pousses de pêcher (*Prunus persica* [L.] Batsch) in vivo était similaire à celle observée pour des suspensions bactériennes in vitro lorsqu'elles sont exposées aux mêmes températures et que dans les deux cas, plus de 10^3 cellules étaient nécessaires pour amorcer le gel à -3°C . Cependant, lors de nos essais, les plantes avaient été endurcies à 1°C avant que le test soit effectué et il est possible que ce traitement au froid puisse accroître de façon marquée l'activité glaçogène des bactéries (Anderson *et al.* 1982, 1987; Rogers *et al.* 1987).

Nos essais démontrent que chez la luzerne, les isolats glaçogènes testés n'ont pas amélioré la tolérance des plantes aux basses températures et la tendance serait plutôt à l'effet contraire. Il est possible que les bactéries affectent les membranes cellulaires qui deviennent alors incapables d'empêcher la formation de glace à l'intérieur des cellules. Les stries brunâtres observées dans les éléments vasculaires suite à l'inoculation des bactéries indiquent d'ailleurs une interaction importante entre la plante et les bactéries au niveau cellulaire. La présence de nucléateurs intrinsèques pourrait également limiter le rôle des bactéries glaçogènes. Il a été démontré que la température de cristallisation de l'eau des tissus végétaux était influencée par la masse de l'échantillon et les tests de nucléation en éprouvettes effectués sur des portions de plantes tendent ainsi à surestimer la capacité de surfusion de la plante entière (Anderson et Ashworth 1985; Ashworth et Davis 1984; Ashworth *et al.* 1985a, 1985b). Paquin (1985) a mentionné que la température de surfusion était d'environ -3°C dans les tissus de la luzerne. Il est donc possible que la luzerne contienne des nucléateurs intrinsèques qui ne sont pas d'origine bactérienne mais qui sont actifs aux mêmes températures que les bactéries.

Finalement, les expériences de congélation ont permis de démontrer que les bactéries provoquaient un brunissement des éléments vasculaires qui s'accroissait sous l'effet des basses températures. On peut donc en conclure qu'avec le temps, les bac-

téries du xylème peuvent contribuer significativement à la détérioration des racines de la luzerne.

Les auteurs remercient Monsieur Jacques St-Cyr pour la réalisation des figures ainsi que le Fonds F.C.A.R. et le Conseil des recherches en pêche et agro-alimentaire du Québec qui ont financé ce travail.

- Anderson, J.A. et E.N. Ashworth. 1985. Ice nucleation in tomato plants. *J. Am. Soc. hortic. Sci.* 110: 291-296.
- Anderson, J.A., D.W. Buchanan, R.E. Stall et C.B. Hall. 1982. Frost injury of tender plants increased by *Pseudomonas syringae* van Hall. *J. Am. Soc. hortic. Sci.* 107: 123-125.
- Anderson, J.A., D.W. Buchanan et R.E. Stall. 1984. Reduction of bacterially induced frost damage to tender plants. *J. Am. Soc. hortic. Sci.* 109: 401-405.
- Anderson, J.A., E.N. Ashworth et G.A. Davis. 1987. Non-bacterial ice nucleation in peach shoots. *J. Am. Soc. hortic. Sci.* 112: 215-218.
- Arny, D.C., S.E. Lindow et C.D. Upper. 1976. Frost sensitivity of *Zea mays* increased by application of *Pseudomonas syringae*. *Nature (Lond.)* 262: 282-284.
- Ashworth, E.N. et G.A. Davis. 1984. Ice nucleation within peach trees. *J. Am. Soc. hortic. Sci.* 109: 198-201.
- Ashworth, E.N., J.A. Anderson et G.A. Davis. 1985a. Properties of ice nuclei associated with peach trees. *J. Am. Soc. hortic. Sci.* 110: 287-291.
- Ashworth, E.N., G.A. Davis et J.A. Anderson. 1985b. Factors affecting ice nucleation in plant tissues. *Plant Physiol.* 79: 1033-1037.
- Azad, H. et N.W. Schaad. 1988. The relationship of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* to frost and the effect of frost on black chaff development in wheat. *Phytopathology* 78: 95-100.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3^e édition. Cambridge University Press, London. 333 pp.
- Gagné, S., C. Richard, H. Rousseau et H. Antoun. 1987. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.* 33: 996-1000.
- Gaudet, D.A., D.C. Sands, D.E. Mathre et R.L. Ditterline. 1980. The role of bacteria in the root and crown rot complex of irrigated sainfoin in Montana. *Phytopathology* 70: 161-167.
- Gusta, L.V. et B.J. O'Connor. 1987. Frost tolerance of wheat, oats, barley, canola and mustard and the role of ice-nucleating bacteria. *Can. J. Plant Sci.* 67: 1155-1165.
- Hirano, S.S. et C.D. Upper. 1986. Bacterial nucleation of ice in plant leaves. Pages 730-738 in S.P. Colowick et N.O. Kaplan (éd.), *Methods in enzymology*. Vol. 127. Academic Press, Inc., New York.
- Hirano, S.S., L.S. Baker et C.D. Upper. 1985. Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury. *Plant Physiol.* 77: 259-265.

- Horsfall, J.G. et E.B. Cowling. 1978. Pathometry: the measurement of plant disease. Pages 119-136 in J.G. Horsfall et E.B. Cowling (réd.), Plant disease, an advanced treatise. Academic Press, Inc., New York.
- Kim, H.K., C. Orser, S.E. Lindow et D.C. Sands. 1987. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. Plant Dis. 71: 994-997.
- Lindow, S.E. 1982. Epiphytic ice nucleation-active bacteria. Pages 335-362 in M.S. Mount et G.H. Lacy (réd.), Phytopathogenic prokaryotes. Vol. 1. Academic Press, Inc., New York.
- Lindow, S.E. 1983. Method of preventing frost injury caused by epiphytic ice-nucleation-active bacteria. Plant Dis. 67: 327-333.
- Lindow, S.E., D.C. Arny et C.D. Upper. 1978a. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. Phytopathology 68: 523-527.
- Lindow, S.E., D.C. Arny, C.D. Upper et W.R. Barchet. 1978b. The role of bacterial ice nuclei in frost injury to sensitive plants. Pages 249-263 in P.H. Li et A. Sakai (réd.), Plant cold hardiness and freezing stress, mechanisms and crop implications. Vol. 1. Academic Press, Inc., New York.
- Lindow, S.E., D.C. Arny et C.D. Upper. 1982a. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. Plant Physiol. 70: 1084-1089.
- Lindow, S.E., S.S. Hirano, W.R. Barchet, D.C. Arny et C.D. Upper. 1982b. Relationship between ice nucleation frequency of bacteria and frost injury. Plant Physiol. 70: 1090-1093.
- Maki, L.R. et K.J. Willoughby. 1978. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. J. appl. Meteorol. 17: 1049-1053.
- Maki, L.R., E.L. Galyan, M.M. Chang-Chien et D.R. Caldwell. 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. Appl. Microbiol. 28: 456-459.
- Paquin, R. 1985. Survie à l'hiver des plantes fourragères et des céréales sous les climats nordiques, en particulier au Québec: progrès et perspectives. Phytoprotection 66: 105-139.
- Paulin, J.P. et J. Luisetti. 1978. Ice nucleation activity among phytopathogenic bacteria. Pages 725-731 in Station de pathologie végétale et phytobactériologie d'Angers (réd.), Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Vol. 2. Gilbert-Clarey, Tours.
- Phelps, P., T.H. Giddings, M. Prochoda et R. Fall. 1986. Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*. J. Bacteriol. 167: 496-502.
- Richard, C., C. Willemot, R. Michaud, M. Bernier-Cardou et C. Gagnon. 1982. Low-temperature interactions in Fusarium wilt and root rot of alfalfa. Phytopathology 72: 293-297.
- Richard, C., S. Gagné et H. Antoun. 1987. A note on the presence of ice nucleation-active bacteria in roots of alfalfa grown in Québec. Phytoprotection 68: 127-129.
- Rogers, J.S., R.E. Stall et M.J. Burke. 1987. Low-temperature conditioning of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia herbicola*. Cryobiology 24: 270-279.
- Scheffé, H. 1959. The analysis of variance. John Wiley & Sons, Inc., New York. 477 pp.
- Siminovitch, D. 1981. Common and disparate elements in the processes of adaptation of herbaceous and woody plants to freezing — a perspective. Cryobiology 18: 166-185.
- Suslow, T.V. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. Pages 187-223 in M.S. Mount et G.H. Lacy (réd.), Phytopathogenic prokaryotes. Vol. 1. Academic Press, Inc., New York.
- Vali, G. 1971. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. J. atmos. Sci. 28: 402-409.
- Vali, G., M. Christensen, R.W. Fresh, E.L. Galyan, L.R. Maki et R.C. Schnell. 1976. Biogenic ice nuclei. Part II: bacterial sources. J. atmos. Sci. 33: 1565-1570.
- Wallin, J.R., D.V. Loonan et C.A.C. Gardner. 1979. *Erwinia stewartii*: an ice nucleus for frost damage to maize seedlings. Plant Dis. Rep. 63: 751-752.
- Yelenosky, G. 1983. Ice nucleation active (INA) agents in freezing of young citrus trees. J. Am. Soc. hortic. Sci. 108: 1030-1034.
- Young, J.M. 1987. Ice-nucleation on kiwifruit. Ann. appl. Biol. 111: 697-704.